

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

22. Okt. 2004



REC'D 04 NOV 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**
Aktenzeichen:

103 36 080.8

Anmeldetag:

06. August 2003

Anmelder/Inhaber:Gnothis Holding SA,
Ecublens/CH**Bezeichnung:**Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung von
lumineszierenden Molekülen, insbesondere nach
der Methode der Fluoreszenzkorrelationsspektros-
kopie**IPC:**

G 01 N 21/64

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. August 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
im Auftrag

Agurks

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte
European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN** (bis 31.1.01)
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**
DR.-ING. **H. LISKA**
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**
DIPL.-PHYS. **B. RUTTENSPERGER**
DIPL.-PHYS. DR.-ING. **V. JORDAN**
DIPL.-CHEM. DR. **M. DEY**
DIPL.-FORSTW. DR. **J. LACHNIT**

Unser Zeichen:

30268P DE/Tlct

Anmelder:

Gnothis Holding SA

**1015 Ecublens
SCHWEIZ**

Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen, insbesondere nach der Methode der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen, insbesondere nach der Methode der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina, insbesondere FCS-Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopieverfahren, welches folgende Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen einer Probe umfassend lumineszierende Moleküle,
- b) Bestrahlen der Probe mit einer optischen Anregungseinrichtung umfassend wenigstens eine Lichtquelle und wenigstens ein insbesondere diffraktives optisches Element zur Aufspaltung von hindurchtretendem Licht in multiple Strahlen und eine Fokussieroptik zur Fokussierung von hindurchtretenden multiplen Lichtstrahlen in multiple konfokale Volumenelemente,
- c) Auffangen von Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen mittels einer ortsauflösenden Sensormatrixanordnung und
- d) Verarbeiten der von der Sensormatrixanordnung bereitgestellten Signale mittels einer Signalverarbeitungs- und -auswerteeinrichtung.

Die Erfindung bezieht sich ebenso auf eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. Ein Verfahren und eine Vorrichtung der vorstehend genannten Art sind aus der WO 02/097406 bekannt.

Die Verfahren und Vorrichtungen nach der WO 02/097406 ermöglichen auf einfache Weise eine parallele Bestimmung von lumineszierenden Molekülen in multiplen konfokalen Volumenelementen durch Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie. Als optische Detektionseinrichtung dient eine ortsauflösende Detektionsmatrix, z.B. zusammengestellt aus Avalanche-Fotodioden.

Zum Stand der Technik wird ferner auf die EP 0679251 B1 verwiesen. In der EP 0679251 B1 sind Grundlagen der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) dargelegt, von denen auch bei den Verfahren nach der WO 02/097406 A1 und der vorliegenden Anmeldung Gebrauch gemacht wird. Der Offenbarungsgehalt der EP 0679251 B1 und der WO 02/097406 A1 werden insoweit auch zum Inhalt der vorliegenden Anmeldung gemacht. Mittels der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie werden stoffspezifische Parameter bestimmt, die durch Lumineszenzmessung an den Analytmolekülen ermittelt werden. Bei diesen Parametern kann es sich um Translationsdiffusions-Koeffizienten, Rotationsdiffusions-Koeffizienten oder/und um die Excitationswellenlänge, die Emissionswellenlänge oder/und die Lebensdauer eines angeregten Zustandes eines lumineszierenden Moleküls oder die Kombination von einer oder mehrerer dieser Messgrößen handeln. Insbesondere kann die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie zur Untersuchung chemischer und fotophysikalischer dynamischer Eigenschaften von Einzelmolekülen genutzt werden (vgl. Rigler, R.; Elson, E. S.; "Fluorescence Correlation Spectroscopy, Theory and Applications; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York, 2001).

In einer Standardanwendung der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie werden die Intensitätsfluktuationen der Fluoreszenzsignale der durch Licht angeregten Moleküle gemessen und eine Autokorrelation dieses Signals vorgenommen. Ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird erreicht, indem das konfokale Detektionsvolumen im Bereich einer Lochblende vorgesehen ist, wobei das konfokale Detektionsvolumen extrem klein sein kann und z.B. im Femtoliterbereich und darunter liegen kann.

Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie kann z.B. verwendet werden, um molekulare Wechselwirkungen, Strukturänderungen, chemische Reaktionen, Bindungen an Zellmembranen, fotophysikalische dynamische Eigenschaften und Transport- bzw. Strömungseigenschaften von Molekülen bzw. Proben zu analysieren.

Ein Anwendungsbereich für die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ist die sogenannte Biochip-Mikroarray-Analyse. Biochips sind in unterschiedlichen Varianten betreffend die Anzahl an Messplatzpunkten verfügbar. So sind Biochips mit einigen wenigen Messplatzpunkten erhältlich, aber auch Biochips, bei denen bis zu 100 000 Messplatzpunkte vorgesehen sind. Die Messzeit zum Untersuchen bzw. Scannen eines Biochip-Mikroarrays mit konfokaler Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ist direkt proportional zur Anzahl der Messpunkte und kann einige Stunden betragen. Die Verwendung von CCD-Kameras mit einigen Tausend Detektorelementen kann das Zeitproblem der parallelen FCS-Detektion von Einzelmolekülen nicht lösen, da CCD-basierte Systeme eine vergleichsweise lange Auslesezeit für die Messergebnisse benötigen und daher dynamische Echtzeitmessungen (1 ns - 1 ms) nicht ohne weiteres ermöglichen. Es besteht somit Bedarf nach einer Parallel-(Multiplex)-Messmethode mit schnell reagierenden, also quasi-Echtzeit-fähigen, wenig Platz beanspruchenden und vergleichsweise preiswerten Detektoreinrichtungen.

Ausgehend von einem Stand der Technik gemäß der WO 02/097406 liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, die Möglichkeit der Quasi-Paralleldetektion von Lumineszenzereignissen aus mehreren konfokalen Volumenelementen zu verbessern.

Hierzu wird erfindungsgemäß vorgeschlagen, als Sensormatrixanordnung eine in IC-Technologie, insbesondere in CMOS-Technologie hergestellte und in einem Sensorchip in Geiger-Modus-Beschaltung integrierte Sensormatrix

aus Avalanche-Fotodioden zum Auffangen der Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen zu verwenden, wobei gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung der Sensorchip bereits Signalverarbeitungs- und -auswerteschaltkreise integriert enthält. Dies sind insbesondere Schaltkreise zur Berechnung von Korrelationsfunktionen (Autokorrelation oder/und Kreuzkorrelation verschiedener Ordnungen) sowie deren Fouriertransformierte.

Der Sensorchip kann eine Vielzahl von Avalanche-Fotodioden in Geiger-Modus-Beschaltung aufweisen, so dass bedarfsweise entsprechend viele konfokale Messvolumina parallel detektiert werden können. Aufgrund der IC-Integration, insbesondere CMOS-Integration der lichtempfindlichen Avalanche-Fotodioden kann überdies erreicht werden, dass Exemplarstreuungen der einzelnen Fotodioden innerhalb des Chips vergleichsweise gering sind und somit die einzelnen integrierten Sensorelemente im Wesentlichen gleiche Detektionseigenschaften aufweisen. Testmessungen haben ergeben, dass ein Beispiel eines CMOS-Sensorchip der hier betrachteten Art nicht den von Fotomultipliern her bekannten Effekt von nachlaufenden Pulsen (after pulsing) zeigt, eine sehr kleine Dunkelzählrate von etwa 40 Hz und eine sehr kurze Totzeit von etwa 30 ns hat. Die integrierten Avalanche-Fotodioden haben eine sehr hohe Empfindlichkeit und sprechen bereits auf einzelne Photonen an. Sie erlauben Einzelmolekülnachweise in den einzelnen betrachteten konfokalen Volumenelementen nach der FCS-Methode.

Die Integration von elektronischen Elementen für den Geiger-Modus-Betrieb der Avalanche-Fotodioden sowie von Signalverarbeitungs- und -auswerteschaltkreisen, insbesondere Korrelatoren, erlaubt extrem schnelle Messungen und einen Quasi -Echtzeit-Mess- und Auswertebetrieb.

Das Verfahren kann grundsätzlich nach den in EP 0679251 B1 oder in WO 02/097406 beschriebenen Methoden durchgeführt werden. Dabei erfolgt vorzugsweise die Messung von einem oder wenigen Analytmolekülen in

5 einem Messvolumen, wobei die Konzentration der zu bestimmenden Analytmoleküle vorzugsweise kleiner 10^{-6} Mol/l beträgt und das Messvolumen vorzugsweise kleiner 10^{-14} l ist. Es werden stoffspezifische Parameter bestimmt, die durch Lumineszenzmessung an den Analytmolekülen ermittelt werden. Auf Einzelheiten zu apparativen Details wird auf die Offenbarung in EP 0679251 B1 und WO 02/097406 verwiesen.

10 Insbesondere kann das erfindungsgemäße Verfahren insoweit entsprechend dem Verfahren nach der WO 02/097406 durchgeführt werden, als in bevorzugten Ausgestaltungen des Verfahrens die lumineszierenden Moleküle aus lumineszenzmarkierten Nachweisreagenzien ausgewählt werden, die an einen in der Probe vorhandenen Analyten binden. Auch kann das Verfahren nach der Erfindung die Messung bzw. Bestimmung eines kreuzkorrelierten Signals umfassen, das von einem, mindestens zwei
15 unterschiedliche Lumineszenzmarkierungen enthaltendem Komplex aus Analyt- und Nachweisreagenz(ien) stammt.

20 Die Molekülbestimmung kann die Messung eines von einem lumineszenzmarkierten Nachweisreagens stammenden Signals umfassen, wobei die Lumineszenzintensität oder/und -abklingzeit des Nachweisreagens bei Bindung an den Analyten verschieden von der Lumineszenzintensität oder/und Abklingzeit im nicht gebundenen Zustand ist. Dabei können die Unterschiede der Lumineszenzintensität oder/und -abklingzeit durch Quench- oder Energietransfervorgänge hervorgerufen werden.

25 Die Molekülbestimmung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann ferner eine Nukleinsäure-Hybridisierung umfassen, wobei eine oder mehrere lumineszenzmarkierte Sonden an eine Zielnukleinsäure binden.

30 Die Molekülbestimmung kann eine Protein-Antikörper-Wechselwirkung umfassen, wobei die Antikörper in unterschiedlichen Lichtwellenlängen (Farben) ermitteln können. Die Signale werden dann bei der

Signalverarbeitung einer Kreuzkorrelation unterworfen.

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine enzymatische Reaktion umfassen.

5

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Nukleinsäure-Amplifikation, insbesondere einen Thermocycling-Prozess umfassen.

10

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Mutationsanalyse bei Nukleinsäuren umfassen.

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Genexpressionsanalyse bei Nukleinsäuren umfassen.

15

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung die Messung einer temperaturabhängigen Schmelzkurve bei einer Nukleinsäure-Hybridisierung umfassen.

20

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Partikel-Selektion umfassen.

Unter einem weiteren Aspekt kann die Molekülbestimmung eine Nukleinsäure-Sequenzierung umfassen.

25

Der verwendete Träger kann gemäß einer Ausführungsform mehrere, insbesondere mindestens zehn und vorzugsweise mindestens 32 separate Behälter zur Aufnahme von Proben enthalten.

30

Alternativ kann die Probe in einer Mikrokanalstruktur bereitgestellt werden, wobei ein in der Probe vorhandener Analyt in der Mikrokanalstruktur vorzugsweise festgehalten wird.

Unter einem weiteren Aspekt kann es vorgesehen sein, dass ein in der Probe vorhandener Analyt einer Spaltungsreaktion unterzogen wird, wobei dem Analyten abgespaltene Fragmente bestimmt werden.

- 5 Der in der Probe vorhandene Analyt kann an ein Trägerpartikel, z.B. aus Kunststoff, Glas, Quarz, Metall oder Verbundwerkstoff, gekoppelt sein.

10 Ganz allgemein lässt sich das Verfahren nach der Erfindung anwenden, um lumineszierende Moleküle, insbesondere Einzelmoleküle, aus einer einzelnen Probe in den verschiedenen konfokalen Messvolumina - oder aus verschiedenen Proben in den konfokalen Messvolumina zu bestimmen. Die Paralleldetektion der Lumineszenzereignisse in mehreren Detektionsvolumina erlaubt ferner die Bestimmung der örtlichen Flussgeschwindigkeit (Geschwindigkeitsprofil) in einem Mikrokanal.

15 Ferner lässt sich das Verfahren zur Bestimmung von Einzelmolekülen in einer Strömung verwenden. Auch können mehrere Messpunkte in einem Probenvolumen durch mehrere Sensorelemente erfasst werden, wodurch die Detektionswahrscheinlichkeit in stark verdünnten Messproben erhöht werden kann.

20 Die erfindungsgemäß vorgeschlagene Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina umfasst:

- 25
- a) eine Trägeranordnung zur Aufnahme einer Probe, die zu bestimmende Moleküle enthält,
 - b) eine optische Anregungseinrichtung, welche multiple Lichtstrahlen bereitstellen kann, insbesondere wenigstens ein diffraktives optisches Element zur Aufspaltung von hindurchtretendem Licht in multiple Strahlen, und eine Fokussieroptik zur Fokussierung
- 30

von hindurchtretenden multiplen Lichtstrahlen in multiple konfokale Volumenelemente in dem jeweiligen Messvolumen zur Anregung von Lumineszenz in den multiplen konfokalen Volumenelementen,

5

- c) eine optische Detektionseinrichtung zum Nachweis von Lumineszenz aus den konfokalen Volumenelementen, wobei die optische Detektionseinrichtung eine ortsauflösende, in IC-Technologie, insbesondere in CMOS-Technologie hergestellte und in einem Sensorchip in Geiger-Modus-Beschaltung integrierte Sensormatrix aus Avalanche-Fotodioden zum Auffangen von Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen umfasst, und

10

15

- d) Signalverarbeitungs- und -auswertemittel zur Verarbeitung der von der Avalanche-Fotodiodenmatrix bereitgestellten Signale.

Wie schon oben angesprochen, ist es vorteilhaft, wenn die Signalverarbeitungs- und -auswertemittel in dem Sensorchip integriert sind, um Quasi-Echtzeitmessungen durchführen zu können.

20

Als integrierte Signalverarbeitungs- und -auswertemittel kommen in Frage, Korrelatoren für Autokorrelationsbestimmungen oder/und ggf. Kreuzkorrelationsbestimmungen. Als Signalverarbeitungs- und -auswertemittel können Schaltkreise zur Durchführung schneller Fourier-Transformationen der Messsignale vorgesehen und in dem Sensorchip integriert sein. Die Korrelatorschaltkreise können in einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung nach dem "Multiple-Tau- bzw. Multiple- τ "-Prinzip Korrelationsoperationen ausführen. Zur Multiple-Tau-Technik kann z.B. auf Schätzel, K., "Correlation Techniques in Dynamic Light Scattering", Journal of Applied Physics B, 1987, S. 193-213, Schätzel, K., "New Concepts in Correlator Design", Proc. of the int. Phys. Conference, Ed. E. Hilger, 1985,

25

30

Ser. 77, S. 175-184, Peters, R., Introduction to the Multiple Tau Correlation Technique, ALV GmbH, 1996, Schätzel, K., Drewel, M., und Stimac, S. "Photon Correlation Measurements at large Lag Times: Improving the Statistical Accuracy", Journal of Modern Optics, Vol. 35, Nr. 4, 1998, S. 711-
5 718, verwiesen werden.

Als Lichtquelle kommt vorzugsweise ein Laser in Betracht. Als diffraktives optisches Element zur Strahlaufspaltung dient vorzugsweise ein dreidimensionales optisches Gitter, das hindurchtretendes Licht beugt und
10 ein vorbestimmtes Beugungsmuster, umfassend multiple optische Foci, erzeugt. Gemäß einer Ausführungsform der Vorrichtung nach der Erfindung hat der Träger mehrere, vorzugsweise mindestens zehn, insbesondere mindestens 100 separate Behältnisse zur Aufnahme von Proben.

15 Gemäß einer anderen Ausgestaltung kann der Träger eine Mikrokanalstruktur mit einem oder mehreren Kanälen aufweisen.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist ferner die Verwendung eines CMOS-Sensorchips mit integrierten Avalanche-Fotodioden in Geiger-Modus-
20 Beschaltung für eine parallele Bestimmung von molekularen Wechselwirkungen in multiplen konfokalen Volumenelementen, insbesondere in einem Verfahren der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie.

Die Erfindung wird nachstehend unter Bezugnahme auf die Figuren näher
25 erläutert.

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels einer Vorrichtung nach der Erfindung und

30 Fg. 2 zeigt schematisch die Beschaltung eines Avalanche-Fotodiodenpixels in dem Sensorchip.

Bei dem in Fig. 1 gezeigten Ausführungsbeispiel einer Vorrichtung nach der Erfindung ist als Lichtquelle ein mit einer Lichtwellenlänge von 532 nm emittierender Dioden-gepumpter Festkörperlaser vorgesehen, dessen Laserstrahl von der Strahlaufweitungsoptik 4 mit den optischen Elementen L1 und L2 aufgeweitet wird, so dass er das diffraktive optische Element 7 im Wesentlichen vollständig ausleuchtet. Unter Verwendung des Kollimators 6 mit den optischen Elementen L3 und L4 und des Mikroskopobjektivs 8 wird der aufgeweitete Laserstrahl in ein Muster multipler Foci aufgespalten und in die Probe (Flüssigkeitstropfen) bei 12 fokussiert. Die durch die fokussierten Teilstrahlen beleuchteten konfokalen Volumenelemente im Probenvolumen sind in der Fig. 1 nicht im Einzelnen dargestellt. Mit 14 ist in Fig. 1 ein dichroitischer Spiegel bezeichnet, welcher das Anregungslicht in das Mikroskopobjektiv 8 und somit zur Probe hin reflektiert. Die von den angeregten Molekülen in den konfokalen Volumina ausgehende Fluoreszenzemission wird über dasselbe Objektiv 8 gesammelt, so dass es durch den dichroitischen Spiegel 14 hindurch zu einem Bandpassfilter 16 gelangt. Das Bandpassfilter diskriminiert das Signallicht gegenüber Rayleigh-Streulicht und Raman-Streulicht. Das Fluoreszenzemissionslicht wird dann durch die Linsengruppe L5 und L6 hindurch auf den Sensorchip 20 geleitet. Der Sensorchip 20 ist ein CMOS-Chip mit einem integrierten Array von Avalanche-Fotodioden in Geiger-Modus-Beschaltung. Mit integriert sind elektronische Komponenten zum Betrieb der Avalanche-Fotodioden und zur Signalverarbeitung, z.B. Quench-Widerstände, Transistoren, Korrelatoren und Rechenschaltkreise für weitere Signalverarbeitungsoperationen. Der Sensorchip 20 wird von einem Rechner 22 ausgelesen, wobei ggf. externe Auswertekomponenten 24 zwischen dem Rechner 22 und dem Sensorchip 20 zwischengeschaltet sein können.

In dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 1 ist der Probenbereich 12 als Tropfen auf einem Mikroskop-Deckglas 9 dargestellt.

Bei der Verwendung der Vorrichtung für die Durchführung eines Hochdurch-

satz-Screening-Verfahrens kommt als entsprechender Probenträger 9 insbesondere eine Mikroarray-Struktur mit einer größeren Anzahl von separaten Probenbehältnissen, etwa 100 oder mehr separaten Probenbehältnissen, in Frage, die durch Vertiefungen in einer Platte gebildet sind. Wenn die Zahl der Behältnisse innerhalb des Trägers größer als die Anzahl der durch das diffraktive optische Element erzeugten Teilstrahlen ist, kann der Träger in mehreren Schritten gescannt werden. Hierzu kann die Optik oder/und der Träger durch geeignete Maßnahmen für die einzelnen Schritte jeweils neu justiert werden.

Für andere Messaufgaben, etwa für die Einzelmolekül-Sequenzierung oder für die Einzelmolekül-Selektion kann ein Träger mit Mikrokanälen für das Probematerial Verwendung finden.

Fig. 2 zeigt schematisch und als Beispiel die elektrischen Komponenten eines CMOS-Fotodiodenpixels. Die Anoden aller Avalanche-Fotodioden AD sind mit einer hohen negativen Spannung VOP von z.B. -18.5 V vorgespannt. Der übrige Bereich des CMOS-Chips befindet sich elektrisch auf Potentialen zwischen Masse GND und der Versorgungsspannung VDD von beispielsweise 5 V.

Ein Pixel umfasst eine z.B. kreisförmige Avalanche-Fotodiode für Einzelphotonendetektion und einen Löschwiderstand bzw. Quench-Widerstand R von z.B. 270 k Ω , welcher in Reihe zwischen der Kathode der Avalanche-Fotodiode AD von der Versorgungsspannung VDD liegt. Die Durchbruchspannung der Diode AD beträgt z.B. 21 V. Die Diode AD ist somit mit einer Spannung von 2.5 V über der Durchbruchspannung vorgespannt.

An jedem Pixelort ist ferner ein einfacher Komparator K auf der Basis eines Standard-Inverters implementiert. Die Gestaltung der Transistoren erlaubt das Setzen der Eingangsschwellwertspannung für das Umschalten auf Ausgabe auf 3 V. Solange keine Ladungsträger in die Multiplikationsregion der

Diode AD gelangen, fließt kein Strom in die Fotodiode AD. Wenn ein Photon die Fotodiode AD trifft, wird der Avalanche-Lawineneffekt ausgelöst. Der Avalanche-Strom entlädt simultan die Diodenkapazität (und parasitäre Kapazitäten an dem Punkt A) und induziert einen Spannungsabfall über dem Widerstand R. Die Spannung über die Diode AD wird geringer. Die Spannung am Knotenpunkt A ändert sich von 5 V auf 2,5 V. Der Komparatorausgang wird daher auf VDD geschaltet. Der Avalanche-Strom wird in einigen Nanosekunden passiv gelöscht. Danach startet der Wiederaufladungsprozess mit einer Zeitkonstanten von etwa 30 ns.

10

Es wurde eine Totzeit von etwa 32 ns für das Sensorelement gemessen. Während des Entladens steigt die Spannung an dem Knotenpunkt A von 2,5 V auf VDD. Der Komparatorausgang wird auf Masse GND geschaltet. Der Ausgang des Komparators K ist mit einem Eingang des bei M gezeigten Multiplexers verbunden, dessen andere Eingänge von anderen Pixelelementen des Sensorarrays belegt sind und der Bestandteil einer einfachen Adressierschaltung ist. Die Multiplexerkomponenten N sind vorzugsweise in den Sensorchip 20 integriert. Anstelle des Quench-Widerstandes R kann in einer alternativen Ausführungsform der Pixel ein im Sättigungsbereich arbeitender Transistor vorgesehen sein.

20

In einem Ausführungsbeispiel des Sensorchips 20 ist der fotosensitive Bereich einer jeweiligen Avalanche-Fotodiode etwa $30 \mu\text{m}^2$. Eine weitere Miniatürisierung ist möglich.

25

Ansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina, insbesondere FCS-Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie-Verfahren, umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen einer Probe (12) umfassend lumineszierende Moleküle,
- b) Bestrahlen der Probe (12) mit einer optischen Anregungseinrichtung (2, 4, 6, 8) umfassend wenigstens eine Lichtquelle und wenigstens ein insbesondere diffraktives optisches Element zur Aufspaltung von hindurchtretendem Licht in multiple Strahlen und eine Fokussieroptik (8) zur Fokussierung von hindurchtretenden multiplen Lichtstrahlen in multiple konfokale Volumenelemente,
- c) Auffangen von Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen mittels einer ortsauflösenden Sensormatrixanordnung (20), wobei die Sensormatrixanordnung eine in IC-Technologie, insbesondere in CMOS-Technologie hergestellte und in einem Sensorchip (20) in Geiger-Modus-Beschaltung integrierte Sensormatrix aus Avalanche-Fotodioden AD ist, und
- d) Verarbeiten der von der Avalanche-Fotodiodenmatrix bereitgestellten Signale mittels einer vorzugsweise in den Sensorchip integrierten Signalverarbeitungs- und -auswerteeinrichtung.

2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Durchführung fluoreszenzkorrelationsspektroskopischer Untersuchungen an lumineszierenden Molekülen, wobei die Signalverarbeitung die Schritte der Autokorrelation oder/und der Kreuzkorrelation oder/und der schnellen Fourier-Transformation (FFT) von Messsignalen bzw. daraus abgeleiteten Informationen umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei Korrelationsschritte verschiedener Korrelationsordnungen zur Signalauswertung durchgeführt werden.

5 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Signalverarbeitung Korrelationsschritte nach dem Ein-Bit-Verfahren oder/und Korrelationsschritte nach dem 4X4-Bit-Verfahren umfasst.

10 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Signalverarbeitung Korrelationsschritte nach dem Multi- τ -Verfahren umfasst.

15 6. Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen durch optische Anregung in konfokalen Messvolumina, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
umfassend:

- 20 a) eine Trägeranordnung (8) zur Aufnahme einer Probe (12), die zu bestimmende Moleküle enthält,
- b) eine optische Anregungseinrichtung (2, 4, 6, 8) zur Bereitstellung multipler Lichtstrahlen und insbesondere umfassend wenigstens eine Lichtquelle (2), wenigstens ein diffraktives optisches Element (7) zur Aufspaltung von hindurchtretendem Licht in multiple Strahlen und eine Fokussieroptik (8) zur Fokussierung von hindurchtretenden multiplen Lichtstrahlen in multiple konfokale Volumenelemente in dem jeweiligen Messvolumen zur Anregung von Lumineszenz in den multiplen konfokalen Volumenelementen,
- 25 30 c) eine optische Detektionseinrichtung (20) zum Nachweis von Lumineszenz aus den konfokalen Volumen-

elementen, wobei die optische Detektionseinrichtung eine ortsauflösende in IC-Technologie, insbesondere in CMOS-Technologie hergestellte und in einem Sensorchip (20) in Geiger-Modus-Beschaltung integrierte Sensormatrix aus Avalanche-Fotodioden AD zum Auffangen von Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen umfasst, und

- d) Signalverarbeitungs- und -auswertemittel zur Verarbeitung der von der Avalanche-Fotodiodenmatrix (20) bereitgestellten Signale.

7. Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen nach Anspruch 6, wobei die Signalverarbeitungs- und -auswertemittel in den Sensorchip (20) integriert sind.

8. Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Signalverarbeitungs- und -auswertemittel wenigstens einen Korrelator, vorzugsweise mehrere Korrelatoren, zur Durchführung von Signalkorrelationsoperatoren, insbesondere zur Bestimmung der Autokorrelationsfunktionen oder/und Kreuzkorrelationsfunktionen erster oder/und höherer Korrelationsordnungen von Messsignalen, umfasst.

9. Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen nach einem der Ansprüche 6 - 8, wobei die Signalverarbeitungs- und -auswertemittel Schaltkreise zur Durchführung einer schnellen Fourier-Transformation der Messsignale umfassen.

Zusammenfassung

Es werden ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung von lumineszierenden Molekülen nach der Methode der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie vorgeschlagen. Das Verfahren umfasst die Schritte:

- a) Bereitstellen einer Probe (12) umfassend lumineszierende Moleküle,
- b) Bestrahlen der Probe (12) mit einer optischen Anregungseinrichtung (2, 4, 6, 8) umfassend wenigstens eine Lichtquelle und wenigstens ein insbesondere diffraktives optisches Element (7) zur Aufspaltung von hindurchtretendem Licht in multiple Strahlen, und eine Fokussieroptik (8) zur Fokussierung von hindurchtretenden multiplen Lichtstrahlen in multiple konfokale Volumenelemente,
- c) Auffangen von Emissionsstrahlung aus den multiplen konfokalen Volumenelementen mittels einer ortsauflösenden Sensormatrixanordnung (20), wobei die Sensormatrixanordnung eine in IC-Technologie, insbesondere in CMOS-Technologie hergestellte und in einem Sensorchip (20) in Geiger-Modus-Beschaltung integrierte Sensormatrix aus Avalanche-Fotodioden AD ist, und
- d) Verarbeiten der von der Avalanche-Fotodiodenmatrix bereitgestellten Signale mittels einer vorzugsweise in den Sensorchip integrierten Signalverarbeitungs- und -auswerteeinrichtung.

(Fig. 1)

Fig. 1

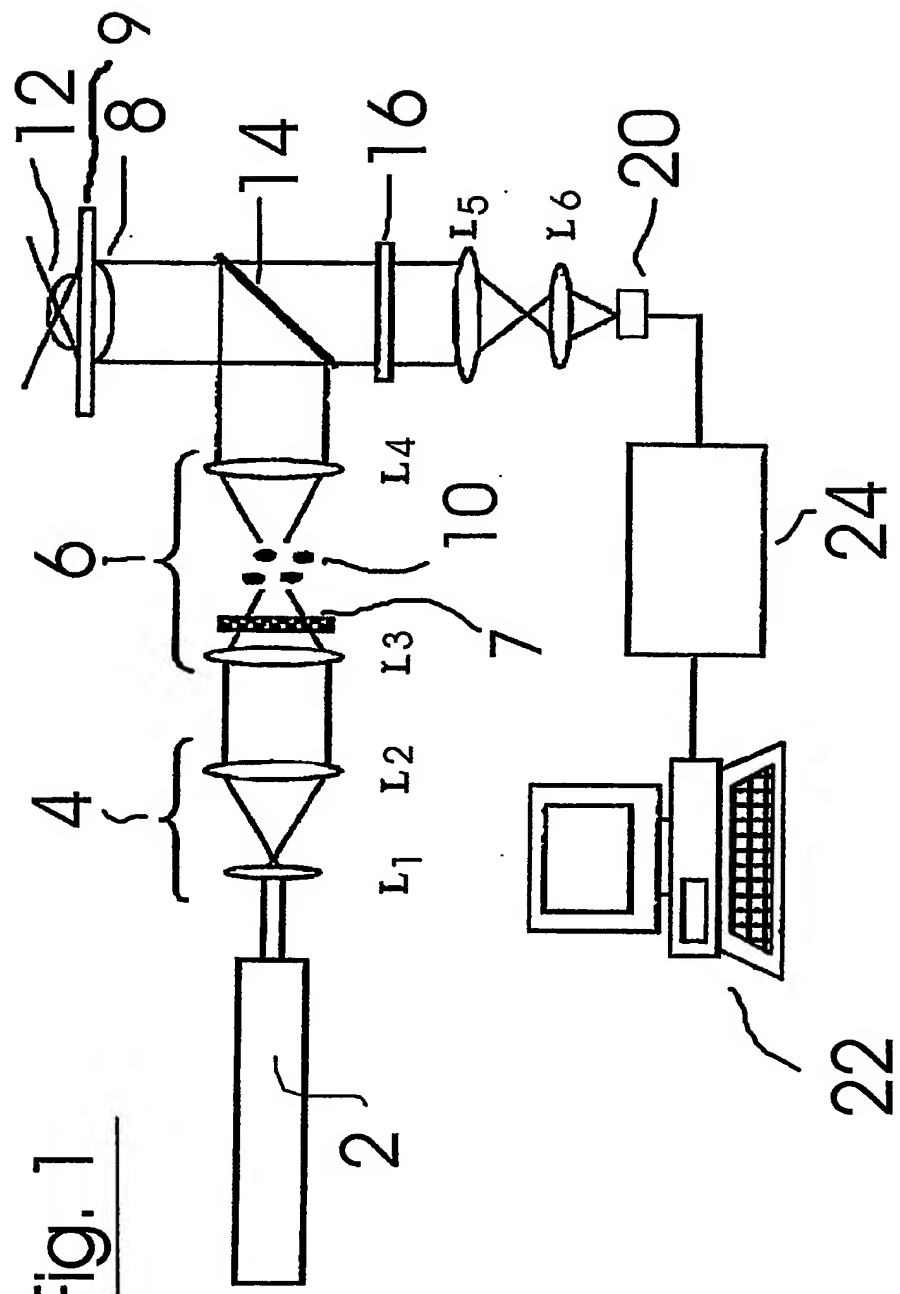


Fig. 1

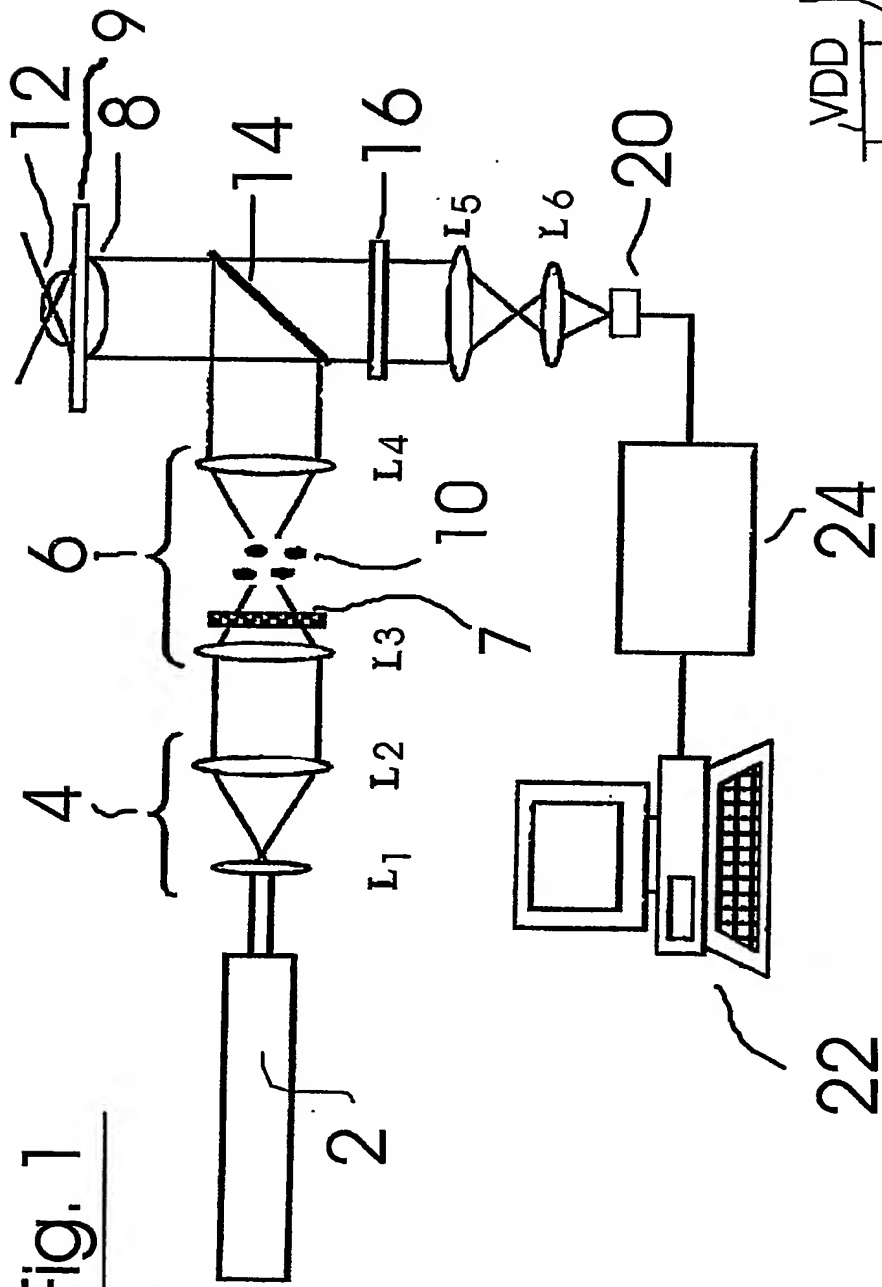


Fig. 2

